

Navodila za uporabo (priročnik) za komplet QIAamp[®] DSP DNA Blood Mini Kit



Različica 3



Za diagnostično uporabo in vitro.

Za uporabo s kompletom QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit



61104



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NEMČIJA



1127543SL

Vsebina

Namen uporabe.....	4
Predvideni uporabnik.....	4
Opis in načelo delovanja	5
Liziranje krvnih celic	5
Vezava genomske DNK na membrano vrtljive kolone QIAamp Mini	5
Odstranjevanje ostankov onesnaževal	6
Elucija prečiščene genomske DNK	6
Izkoristek in kakovost genomske DNK	7
Samodejno prečiščevanje na QIAcube Connect MDx.....	7
Povzetek in obrazložitev	10
Potrebna oprema, ki je vključena v dobavo	11
Vsebina kompleta.....	11
Sestavni deli kompleta	12
Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo	13
Dodatni reagenti.....	13
Potrošni material	13
Oprema	13
Samo za vakuumski postopek.....	13
Samo za avtomatizirani postopek	14
Opozorila in varnostni ukrepi	15
Varnostne informacije	15
Varnostni ukrepi	16

Odstranjevanje	17
Shranjevanje in ravnanje z reagenti	18
Stabilnost med uporabo	18
Zbiranje in shranjevanje vzorcev ter ravnanje z njim	19
Pomembne opombe	21
Pomembne točke pred zagonom protokola	21
Priprava reagentov in pufrov	22
Ravnanje z vrtljivimi kolonami QIAamp Mini	23
Nastavitev vakuumskega sistema QIAvac 24 Plus	24
Postopek	26
Protokol: Izolacija in prečiščevanje genomske DNK iz vzorcev krvi z uporabo mikrocentrifuge/samodejnega prečiščevanja na QIAcube Connect MDx	26
Protokol: Izolacija in prečiščevanje genomske DNK iz vzorcev krvi z uporabo vakuumskega sistema	30
Nadzor kakovosti	34
Omejitve	35
Značilnosti delovanja	36
Navodila za odpravljanje težav	37
Simboli	40
Informacije za naročanje	43
Zgodovina revizije dokumenta	45

Namen uporabe

Komplet QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit je sistem, ki uporablja tehnologijo membrane na osnovi silicijevega dioksida (tehnologijo QIAamp) za izolacijo in prečiščevanje genomske DNK iz bioloških vzorcev.

Komplet QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit je namenjen za diagnostično uporabo in vitro.

Predvideni uporabnik

Izdelek je namenjen za uporabo s strani profesionalnih uporabnikov, npr. tehnikov in zdravnikov, ki so usposobljeni glede molekularnih bioloških tehnik.

Opis in načelo delovanja

Vsak postopek QIAamp DSP DNA Blood Mini vsebuje 4 korake:

- liziranje celic v vzorcu krvi,
- vezava genomske DNK v celičnem lizatu na membrano vrtljive kolone QIAamp Mini,
- izpiranje membrane,
- elucija genomske DNK iz membrane.

Ta priročnik vsebuje protokole za 2 alternativna postopka QIAamp DSP DNA Blood Mini: postopek vrtenja, ki zahteva centrifugo ali pa ga je mogoče avtomatizirati na QIAcube® Connect MDx (slika 1), in postopek vakuuma, ki zahteva centrifugo in vakuumski sistem (glejte diagram poteka, stran 9).

Liziranje krvnih celic

Vzorci se lizirajo v denaturacijskih pogojih pri povišanih temperaturah. Liza se izvaja v prisotnosti proteaze QIAGEN® Protease (QP) in pufra za lizo (AL).

Vezava genomske DNK na membrano vrtljive kolone QIAamp Mini

Za optimizacijo vezave genomske DNK na membrano vrtljive kolone QIAamp Mini se v lizate najprej doda etanol. Nato se vsak lizat nanese na vrtljivo kolono QIAamp Mini in genomska DNK se adsorbira na silikatno membrano, ko se lizat vleče skozi z vakuumskim tlakom ali centrifugalno silo.

Odstranjevanje ostankov onesnaževal

Medtem ko genomska DNK ostaja vezana na membrano vrtljive kolone QIAamp Mini, onesnaževalce učinkovito speremo s pomočjo pufra za spiranje 1 (AW1) in nato pufra za spiranje 2 (AW2).

Elucija prečiščene genomske DNK

Genomska DNK se eluira iz membrane vrtljive kolone QIAamp Mini z uporabo 50–200 µl pufra za elucijo (AE). Eluirana DNK je pripravljena za uporabo v različnih zaključnih testih, vključno v različnih diagnostičnih zaključnih testih in vitro. Pred nanosom na kolono je treba pufer za elucijo (AE) izenačiti s sobno temperaturo (15–25 °C).

Zaradi preostalega pufra za elucijo, ki ga po centrifugiranju zadrži membrana vrtljive kolone, je količina eluata lahko nižja od količine pufra za elucijo (AE), ki je nanesen na kolono. Volumen zbranega eluata je odvisen od lastnosti vzorca. Eluirana DNK se zbira v epruveh za elucijo (ET) in jo je mogoče do 4 tedne hraniti pri temperaturi 2–8 °C. Pri dolgotrajnem shranjevanju priporočamo temperaturo –20 °C.

Opomba: Stabilnost eluata je zelo odvisna od različnih dejavnikov in povezana s specifičnimi zaključnimi postopki. Ovrednotena je bila za komplet QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit v povezavi z vzorčnimi zaključnimi postopki. Dolžnost uporabnika je, da si za ugotavljanje pravih pogojev shranjevanja ogleda navodila za uporabo pri specifičnem zaključnem postopku, ki se uporablja v njegovem laboratoriju, in/ali potrdi celoten potek dela.

Izkoristek in kakovost genomske DNK

Izkoristek DNK je odvisen od vzorca in kakovosti vhodnega materiala. Z elucijo v manjšem volumnu se poveča končna koncentracija DNK v eluatu, a se skupni izkoristek DNK rahlo zmanjša. Priporočamo uporabo volumna elucije, ki je primeren za predvideni zaključni postopek.

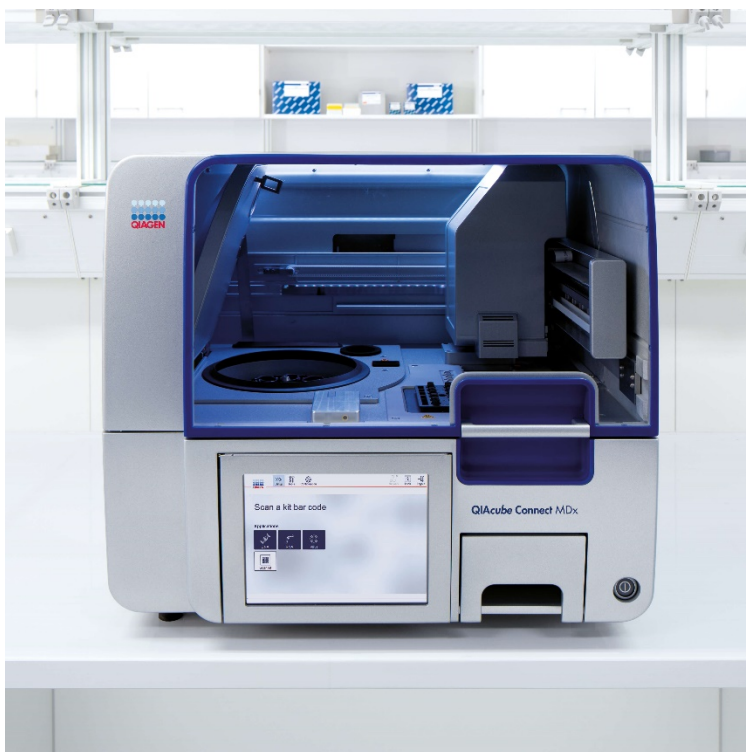
Izkoristek in kakovost izolirane genomske DNK sta primerna za zaključne postopke odkrivanja v molekularni diagnostiki, kot je PCR. Diagnostične teste je treba izvajati v skladu z navodili proizvajalca.

Samodejno prečiščevanje na QIAcube Connect MDx

QIAcube Connect MDx izvaja avtomatizirano izolacijo in prečiščevanje nukleinskih kislin. Na en postopek lahko obdela do 12 vzorcev.

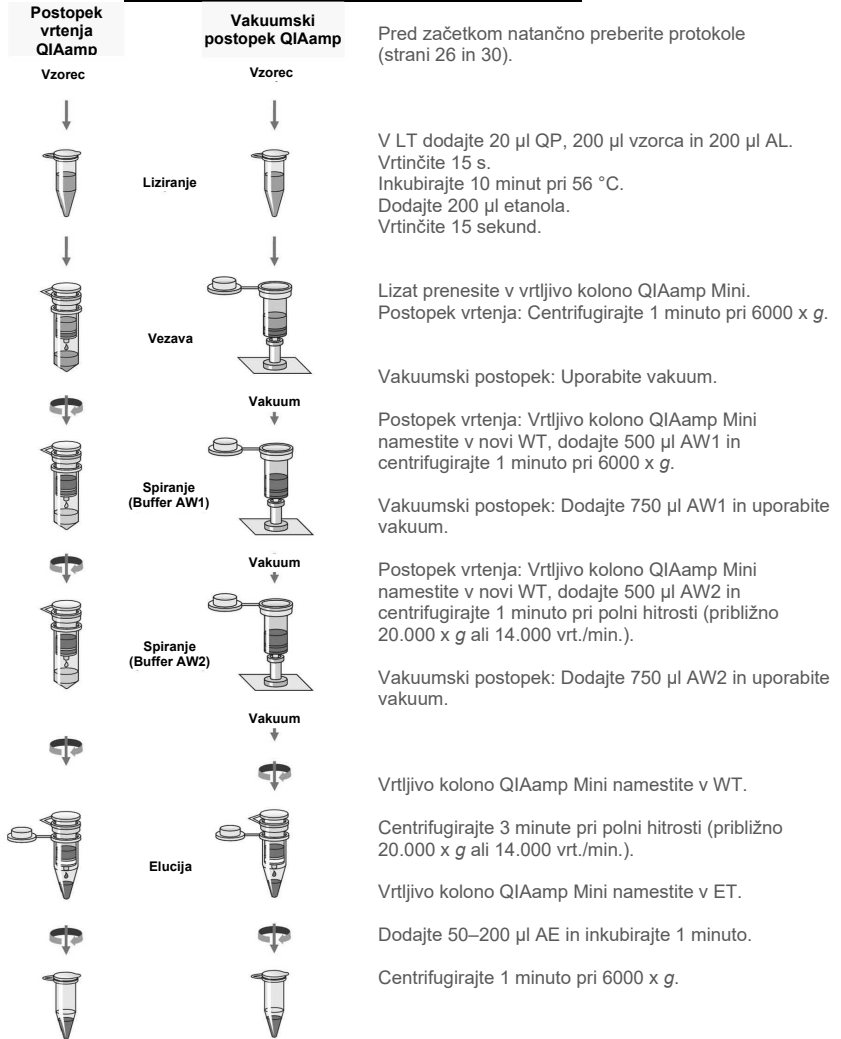
Priprava vzorcev z uporabo QIAcube Connect MDx sledi istim korakom kot pri ročnem postopku (tj. liziranje, vezanje, izpiranje in elucija), kar vam omogoča, da še naprej uporabljate komplet QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit za prečiščevanje visokokakovostne DNK.

Če avtomatizirate komplet QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit na instrumentu QIAcube Connect MDx, lahko zaradi avtomatiziranega pipetiranja instrumenti obdelajo manj kot 50 vzorcev zaradi mrtvih volumnov, izhlapevanja in dodatne porabe reagenta. Družba QIAGEN zagotavlja samo 50 pripravkov vzorcev z ročno uporabo kompleta QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.



Slika 1. QIAcube Connect MDx.

Postopki vrtenja in vakuumski postopki QIAamp DSP DNA Blood Mini



Pred začetkom natančno preberite protokole (strani 26 in 30).

V LT dodajte 20 µl QP, 200 µl vzorca in 200 µl AL. Vrtinčite 15 s. Inkubirajte 10 minut pri 56 °C. Dodajte 200 µl etanola. Vrtinčite 15 sekund.

Lizat prenesite v vrtljivo kolono QIAamp Mini. Postopek vrtenja: Centrifugirajte 1 minuto pri 6000 x g.

Vakuumski postopek: Uporabite vakuum.

Postopek vrtenja: Vrtljivo kolono QIAamp Mini namestite v novi WT, dodajte 500 µl AW1 in centrifugirajte 1 minuto pri 6000 x g.

Vakuumski postopek: Dodajte 750 µl AW1 in uporabite vakuum.

Postopek vrtenja: Vrtljivo kolono QIAamp Mini namestite v novi WT, dodajte 500 µl AW2 in centrifugirajte 1 minuto pri polni hitrosti (približno 20.000 x g ali 14.000 vrt./min.).

Vakuumski postopek: Dodajte 750 µl AW2 in uporabite vakuum.

Vrtljivo kolono QIAamp Mini namestite v WT.

Centrifugirajte 3 minute pri polni hitrosti (približno 20.000 x g ali 14.000 vrt./min.).

Vrtljivo kolono QIAamp Mini namestite v ET.

Dodajte 50–200 µl AE in inkubirajte 1 minuto.

Centrifugirajte 1 minuto pri 6000 x g.

Povzetek in obrazložitev

Komplet QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit uporablja dobro uveljavljeno tehnologijo za hiter in enostaven način izolacije in prečiščevanja genomske DNK iz 200 µl polne krvi.

Postopki QIAamp DSP DNA Blood Mini, ki so namenjeni sočasni obdelavi več vzorcev krvi, dajo prečiščeno DNK, pripravljeno za uporabo. Postopki so primerni za uporabo s svežo ali zamrznjeno polno krvjo in krvjo, ki je bila obdelana s citratom ali EDTA.

Predhodna ločitev levkocitov ni potrebna. Postopki ne zahtevajo niti ekstrakcije fenola/kloroforma niti oborin alkohola in zahtevajo minimalno interakcijo uporabnika, kar omogoča varno obdelavo potencialno nalezljivih vzorcev. Postopki so namenjeni zmanjšanju navzkrižnega onesnaženja med vzorci. Prečiščena DNK je pripravljena za uporabo v PCR ali drugih aplikacijah, alternativno pa jo lahko dolgotrajno shranimo pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preprosti postopki centrifugiranja in vakuumski postopki QIAamp DSP so primerni za sočasno obdelavo več vzorcev. Nekatere postopke vrtenja QIAamp je mogoče popolnoma avtomatizirati na QIAcube Connect MDx za večjo standardizacijo in enostavnost uporabe (stran 7).

Pri vakuumskem postopku sta za protokol potrebna vakuumski sklop (npr. QIAvac 24 Plus s sistemom QIAvac Connecting System) in vakuumska črpalka, ki lahko ustvari vakuum približno 800–900 mbar (npr. vakuumska črpalka QIAGEN Vacuum Pump). Za enostavno spremljanje tlaka vakuuma in priročno sproščanje vakuuma je treba uporabiti Vacuum Regulator (del sistema QIAvac Connecting System).

Potrebna oprema, ki je vključena v dobavo

Vsebina kompleta




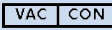
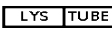

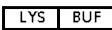



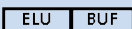


Komplet QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

Kataloška št.

61104

Število pripravkov

50

	Identiteta	Simboli	Količina
5	QIAamp Mini Spin Columns with Wash Tubes (WT) (QIAamp Mini Spin Columns z epruветami za spiranje) (2 ml)		50
ET	Elution Tubes (Epruветe za elucijo) (1,5 ml)	 	50
VC	VacConnectors		50
LT	Lysis Tubes (Epruветe za lizo) (1,5 ml)		50
WT	Wash Tubes (Epruветe za spiranje) (2 ml)		3 × 50
AL	Lysis Buffer* (Pufer za lizo)		12 ml
AW1	Wash Buffer 1 [†] (Pufer za spiranje 1) (koncentrat)		19 ml
AW2	Wash Buffer 2 [‡] (Pufer za spiranje 2) (koncentrat)		13 ml
AE	Elution Buffer [‡] (Pufer za elucijo)		25 ml
PS	Protease Solvent [‡] (Topilo proteaze)		2 ml
QP	QIAGEN Protease [§] (Proteaza Qiagen)		1 viala
-	Navodila za uporabo (priročnik)		1

* Če avtomatizirate komplet QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit na instrumentu QIAcube Connect MDx, lahko zaradi avtomatiziranega pipetiranja instrumenti obdelajo manj kot 50 vzorcev zaradi mrtvih volumnov, izhlapevanja in dodatne porabe reagenta. Družba QIAGEN zagotavlja samo 50 pripravkov vzorcev z ročno uporabo kompleta QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

[†] Vsebuje gvanidinijev klorid. Ni združljiv z razkužili, ki vsebujejo belilo. Za več informacij si oglejte Varnostne informacije na strani 15.

[‡] Vsebuje konzervans natrijev azid.

[§] Resuspenzijski volumen 1,2 ml. Glejte »Priprava reagentov in pufrov« na strani 22.

Sestavni deli kompleta

Glavni sestavni deli kompleta, ki vsebujejo aktivne sestavine, so opisani spodaj.

Reagent	Aktivne sestavine	Koncentracija (w/w) (%)
QIAGEN Protease	Subtilisin	≥ 0 do ≤ 100
AL	Gvanidinijev klorid	≥ 30 do < 50
	Maleinska kislina	$\geq 0,1$ do < 1
AW1	Gvanidinijev klorid	≥ 50 do < 70

Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo

Dodatni reagenti

- Etanol (od 96- do 100-odstotni)*

Potrošni material

- Pipete† in konice za pipete (za preprečevanje navzkrižnega onesnaženja močno priporočamo uporabo konic za pipete z aerosolnimi pregradami)
- Rokavice za enkratno uporabo

Oprema

- Grelni blok† za lizo vzorcev pri 56 °C (za mikro testne epruvete 1,5 ml)
- Mikrocentrifuga†
- Merilni valj (50 ml)
- Vibracijski mešalnik

Samo za vakuumski postopek

- Vakuumski sistem QIAvac 24 Plus (kat. št. 19413) ali enakovreden sistem†
- VacValves (kat. št. 19408)
- QIAvac Connecting System (kat. št. 19419)
- Vacuum Pump (kat. št. 84020)
- Vacuum Regulator (kat. št. 19530)

* Ne uporabljajte denaturiranega alkohola, ki vsebuje druge snovi, kot je metanol ali metiletilketon.

† Da bi zagotovili pravilno obdelavo vzorcev med postopki QIAamp DSP DNA Blood Mini, močno priporočamo, da instrumente (npr. pipete in grelne bloke) preverite in umerite v skladu s priporočili proizvajalcev.

Samo za avtomatizirani postopek

- Instrument QIAcube Connect MDx (kat. št. 9003070)*
- Rotor Adapters (kat. št. 990394)
- Rotor Adapter Holder (kat. št. 990392)
- Sample Tubes CB (kat. št. 990382; epruveta za vstavljanje vzorcev)
- Shaker Rack Plugs (kat. št. 9017854)
- Reagent Bottles, 30 ml (kat. št. 990393)
- Filter Tips, 1000 µl (kat. št. 990352)
- Filter Tips, 200 µl (kat. št. 990332)
- SafeSeal Tube, 1,5 ml (Sarstedt®, kat. št. 72.706)

* Da bi zagotovili pravilno obdelavo vzorcev med postopki QIAamp DSP DNA Blood Mini, močno priporočamo, da instrumente (npr. pipete in grelne bloke) preverite in umerite v skladu s priporočili proizvajalcev.

Opozorila in varnostni ukrepi


Upoštevajte, da boste morda morali preveriti, kakšni so lokalni predpisi za poročanje o resnih incidentih, do katerih je prišlo v zvezi s pripomočkom, proizvajalcu in/ali njegovemu pooblaščenemu zastopniku ter regulativnemu organu, v državi katerega biva uporabnik in/ali bolnik.

Za diagnostično uporabo in vitro.

Pred uporabo kompleta natančno preberite vsa navodila.

Varnostne informacije

Pri delu s kemikalijami vedno nosite ustrezno laboratorijsko haljo, rokavice za enkratno uporabo in zaščitna očala. Več informacij poiščite v ustreznih varnostnih listih (Safety Data Sheet, SDS). Ti so v priročni in kompaktni obliki PDF na voljo v spletu na naslovu www.qiagen.com/safety, kjer lahko najdete, preberete in natisnete varnostne liste (safety data sheet, SDS) za vse QIAGEN Kit ter njihove sestavne dele.

<p>POZOR</p> 	<p>NE dodajajte belila ali kislih raztopin neposredno v odpadke, nastale pri pripravi vzorca.</p>
---	---

- Pufer za lizo (AL) in pufer za spiranje 1 (AW1) vsebujeta gvanidinijev klorid, ki lahko v kombinaciji z belilom tvori zelo reaktivne spojine. Če se tekočina, ki vsebuje te pufre, razlije, jo očistite z ustreznim laboratorijskim detergentom in vodo. Če razlita tekočina vsebuje snovi, ki lahko povzročijo okužbe, polito območje očistite najprej z laboratorijskih detergentom in vodo ter nato še z 1-odstotno (v/v) raztopino natrijevega hipoklorita. Če so steklenice pufra poškodovane ali puščajo, pri odstranjevanju steklenic nosite rokavice in zaščitna očala, da se izognete svojim telesnim poškodbam ali poškodbam drugih oseb.

- Družba QIAGEN ni testirala tekočih odpadkov, ki nastanejo pri postopkih QIAamp DSP DNA Blood Mini glede ostankov kužnih snovi. Onesnaženje tekočih odpadkov z ostanki kužnih snovi je malo verjetno, vendar ga ni mogoče popolnoma izključiti. Zato je treba tekoče odpadke obravnavati kot kužne in jih ravnati ter zavreči v skladu z lokalnimi varnostnimi predpisi.
- Primerki in vzorci so lahko kužni. Odpadni vzorec in analizo odložite v skladu z lokalnimi varnostnimi postopki.

Informacije za nujne primere

CHEMTREC

ZDA in Kanada 1-800-424-9300

Zunaj ZDA in Kanade +1 703-527-3887

Varnostni ukrepi

Naslednji stavki o nevarnosti in previdnostni stavki veljajo za komponente kompleta QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

Buffer AL



Vsebuje: gvanidinijev klorid in maleinsko kislino. Opozorilo! Lahko je zdravju škodljiv pri zaužitju ali vdihavanju. Povzroča draženje kože. Lahko povzroči alergijski odziv kože. Povzroča hudo draženje oči. Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščito za obraz/oči. Ob slabem počutju pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE ali zdravnika. Če se pojavi draženje kože ali izpuščaj; poiščite zdravniško pomoč. Sleči kontaminirana oblačila in jih oprati pred ponovno uporabo. Vsebino/posode je treba zavreči na odobrena odlagališča.

Buffer AW1



Vsebuje: gvanidinijev klorid. Opozorilo! Zdravju škodljivo pri zaužitju ali vdihavanju. Povzroča draženje kože. Povzroča hudo draženje oči. Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščito za obraz/oči. Sleči kontaminirana oblačila in jih oprati pred ponovno uporabo. Vsebino/posode je treba zavreči na odobrena odlagališča.

QIAGEN Protease



Vsebuje: subtilisin. Nevarnost! Škodljiv v primeru zaužitja. Povzroča draženje kože. Povzroča resne poškodbe oči. Lahko povzroči simptome alergije ali astme ali težave z dihanjem pri vdihavanju. Lahko povzroči draženje dihal. Ne vdihavati prahu/dima/plina/meglvice/hlapov/razpršila. Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščito za obraz/oči. Nositi zaščito za dihalo. PRI STIKU Z OČMI: previdno izpirajte z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem. V PRIMERU IZPOSTAVLJENOSTI ALI ZASKRBLJENOSTI: Takoj pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE ali zdravnika. Osebo premaknite na svež zrak in jo ohranjajte v udobnem položaju za dihanje.

Odstranjevanje

Odpadki vsebujejo vzorce in reagente. Ti odpadki lahko vsebujejo strupene ali kužne snovi in jih je treba ustrezno odstraniti. Za pravilne postopke odstranjevanja glejte lokalne varnostne predpise.

Več informacij poiščite v ustreznih varnostnih listih (Safety Data Sheet, SDS). Ti so v obliki PDF na voljo na spletu na naslovu www.qiagen.com/safety, kjer lahko najdete, preberete in natisnete varnostne liste (safety data sheet, SDS) za vse komplete QIAGEN in njihove sestavne dele.

Shranjevanje in ravnanje z reagenti

Pozorni morate biti na roke uporabnosti in pogoje shranjevanja, natisnjene na škatli in nalepkah vseh sestavnih delov. Sestavnih delov, ki jim je potekel rok uporabnosti ali pa so bili nepravilno shranjeni, ne uporabljajte.

Vrtljive kolone QIAamp Mini po prejemu shranite pri temperaturi od 2–8 °C in jih uporabite do izteka roka uporabnosti, navedenega na škatli kompleta.

Opomba: Da boste poskrbeli za to, da se sestavni deli kompleta ne bodo mešali med seboj, označite vrtljive kolone QIAamp Mini z ustrezno serijsko številko kompleta.

Vse pufre je treba hraniti pri sobni temperaturi (15–25 °C) do izteka roka uporabnosti, navedenega na škatli kompleta.

Liofilizirano proteazo QIAGEN Protease (QP) lahko hranite pri sobni temperaturi (15–25 °C) do izteka roka uporabnosti kompleta, ne da bi to vplivalo na delovanje.

Stabilnost med uporabo

Rekonstituirana proteaza QIAGEN Protease (QP) je stabilna do 1 leta, če je shranjena pri 2–8 °C, vendar le do izteka roka uporabnosti kompleta. Rastopine proteaze QIAGEN Protease (QP) za zalogo ne smete predolgo hraniti pri sobni temperaturi.

Rekonstituirani pufer za spiranje 1 (AW1) in rekonstituirani pufer za spiranje 2 (AW2) sta stabilna do 1 leta, če sta shranjena pri sobni temperaturi (15–25 °C), vendar le do izteka roka uporabnosti kompleta.

Za pripravo pufrov za avtomatizirani postopek upoštevajte navodila v uporabniškem priročniku *QIAcube Connect MDx* (ki ga najdete na zavihku z viri na strani z izdelki na spletnem mestu www.qiagen.com).

Zbiranje in shranjevanje vzorcev ter ravnanje z njim

Opomba: Stabilnost vzorca je zelo odvisna od različnih dejavnikov in povezana s specifičnimi zaključnimi postopki. Ocenjena je z vzorčnimi zaključnimi postopki. Dolžnost uporabnika je, da si za ugotavljanje pravih pogojev shranjevanja ogleda navodila za uporabo pri specifičnem zaključnem postopku, ki se uporablja v njegovem laboratoriju, in/ali potrdi celoten potek dela.

Za splošna priporočila o zbiranju, transportu in shranjevanju si oglejte odobrene smernice CLSI MM13-A, »Zbiranje, transport, priprava in shranjevanje vzorcev za molekularne metode«. Poleg tega je treba med pripravo, shranjevanjem, transportom in splošnim ravnanjem upoštevati navodila proizvajalca za izbrani pripomoček za odvzem vzorcev. Neodvisno od navodil proizvajalca epruвет za odvzem krvi je treba upoštevati standard ISO 20186-2:2019 (E) za ekstrakcijo genske DNK iz venske polne krvi.

Opomba: V skladu s standardom ISO 20186-2:2019(E) lahko heparin iz epruвет za odvzem krvi lahko vpliva na čistost izoliranih nukleinskih kislin, potencialni prenos v eluate pa lahko v nekaterih zaključnih postopkih povzroči zaviranje. Zato priporočamo uporabo krvnih vzorcev, obdelanih z EDTA ali citratom kot antikoagulantom.

Če uporabljate sveže vzorce krvi v primarnih epruветah, jih pred prenosom vzorcev temeljito zmešajte (npr. tako, da epruвете večkrat obrnete). Zamrznjene vzorce (z največ 3 cikli zamrzovanja/odtajanja) je treba hitro odtaliti v vodni kopeli s temperaturo 37 °C in pri tem rahlo mešati, da bo mešanje temeljito, nato pa pred začetkom postopka izenačiti temperaturo s sobno (15–25 °C). Ne uporabljajte vzorcev krvi, ki so bili zamrznjeni in odmrznjeni več kot trikrat. Da poskrbite za zanesljiv prenos vzorca, preprečite tvorjenje pene v epruветah. Poskusite preprečiti krvne strdke v vzorcih in prenašajte vzorec brez strdkov. Krioprecipitati, ki nastanejo med odmrzovanjem zamrznjenih vzorcev, bodo zamašili membrano vrtljive kolone QIAamp Mini ali pa ovirali avtomatizirani postopek na QIAcube Connect MDx. Če so krioprecipitati vidni, jih ne aspirirajte.

Izkoristek in kakovost očiščene DNK sta odvisna od pogojev shranjevanja krvi. Pri bolj svežih vzorcih so rezultati lahko boljši. Pri kratkoročnem shranjevanju do 10 dni priporočamo shranjevanje pri temperaturi 2–8 °C. Vendar pri načinih uporabe, pri katerih je zahtevana največja velikost fragmentov, kot je Southernov prenos, priporočamo shranjevanje pri temperaturi 2–8 °C samo do 3 dni, saj po tem času pride do nizkih ravni razgradnje DNK. Pri dolgoročnem shranjevanju (daljšem od 10 dni) odvzemite kri v epruvete, ki vsebujejo antikoagulant (če je zahtevana DNK z visoko molekulsko maso, po možnosti EDTA), in jo shranite pri temperaturi –20 ali –80 °C.

Pomembne opombe

Pomembne točke pred zagonom protokola

- Ob prejemu kompleta preverite, ali so kateri sestavni deli morda poškodovani. Če so pretisni omoti ali steklenice s pufrom poškodovane, se obrnite na Oddelek za tehnične storitve družbe QIAGEN ali lokalnega distributerja. Ob razlitju tekočine glejte »Varnostne informacije« (stran 15). Poškodovanih sestavnih delov kompleta ne smete uporabiti, ker se sicer lahko zgodi, da z uporabo kompleta ne boste dobili želenih rezultatov.
- Med prenosi tekočin vedno menjavajte konice za pipete. Za zmanjšanje navzkrižnega onesnaženja, priporočamo uporabo konic za pipete z aerosolno pregrado.
- Med celotnim postopkom vedno uporabljajte rokavice za enkratno uporabo in redno preverjajte, ali niso onesnažene z vzorci. Zavržite rokavice, če so onesnažene.
- Za zmanjšanje navzkrižnega onesnaženja hkrati odprite samo eno epruveto.
- Ko končate vse korake pulznega vibracijskega mešanja, na hitro centrifugirajte epruvete z mikrocentrifugo in tako odstranite kapljice z notranje strani pokrovov. Uporabnik mora poskrbeti, da je med celotnim postopkom zagotovljena sledljivost vzorcev.
- Vsi koraki centrifugiranja se izvajajo pri sobni temperaturi (15–25 °C).
- Kompleta, ki ga trenutno uporabljate, ne uporabljajte skupaj s sestavnimi deli iz drugih kompletov, razen če imajo povsem enake serijske številke.
- Preprečite onesnaženje reagentov iz kompleta z mikrobi.
- Za zmanjšanje tveganja za okužbo s potencialno kužnim materialom, priporočamo, da delate v laminarnih pogojih zračnega toka, dokler se vzorci ne lizirajo.
- Ta komplet lahko uporablja samo osebje, usposobljeno za delo z diagnostičnimi laboratorijskimi pripomočki in vitro.

Priprava reagentov in pufrov

- Priprava proteaze QIAGEN Protease

Dodajte 1,2 ml topila proteaze (PS) v vialo liofilizirane proteaze QIAGEN Protease (QP) in previdno zmešajte. Da se izognete penjenju, zmešajte tako, da vialo večkrat obrnete. Prepričajte se, da je proteaza QIAGEN Protease (QP) popolnoma raztopljena.

Pomembno: Ne dodajajte proteaze QIAGEN Protease (QP) neposredno v pufer za lizo (AL).

- Priprava pufru za spiranje 1

Z merilnim valjem dodajte 25 ml etanola (96–100 %) v steklenico z 19 ml pufru za spiranje 1 (AW1). Rekonstituirani pufer za spiranje 1 (AW1) shranjujte pri sobni temperaturi (15–25 °C).

Pomembno: Rekonstituirani pufer za spiranje 1 (AW1) vedno zmešajte tako, da steklenico večkrat obrnete, preden začnete postopek.

- Priprava pufru za spiranje 2

Z merilnim valjem dodajte 30 ml etanola (96–100 %) v steklenico z 13 ml pufru za spiranje 2 (AW2). Rekonstituirani pufer za spiranje 2 (AW2) shranjujte pri sobni temperaturi (15–25 °C).

Pomembno: Rekonstituirani pufer za spiranje 2 (AW2) vedno zmešajte tako, da steklenico večkrat obrnete, preden začnete postopek.

- Priprava pufru za elucijo

Kompletu je priložena ena steklenica pufru za elucijo (AE). Za preprečevanje onesnaženja pufru za elucijo (AE), močno priporočamo, da za pipetiranje pufru za elucijo (AE) iz steklenice uporabljate konice za pipete z aerosolnimi pregradami, ter da takoj po koncu postopka zamenjate pokrovček steklenice.

Pomembno: Pufer za elucijo (AE) vsebuje konzervans natrijev azid, ki kaže absorpcijo pri 260 nm. Zato pri kvantificiranju DNK v eluatu z merjenjem absorpcije pri 260 nm, pri določanju čistosti DNK v eluatu z meritvami absorpcije pri 260 nm in 280 nm ali pri skeniranju absorpcije v območju med 220 nm in 350 nm, zagotovite, da prazno mesto vsebuje enako koncentracijo natrijevega azida kot eluat. Če na primer pripravljate eluat za meritve absorpcije z redčenjem 50 µl eluata s 100 µl vode, potem pripravite prazno mesto z razredčenjem 50 µl pufera za elucijo (AE) s 100 µl vode. Za razredčine uporabite svežo, destilirano vodo.

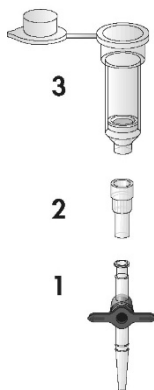
Ravnanje z vrtljivimi kolonami QIAamp Mini

Zaradi občutljivosti tehnologij pomnoževanja nukleinske kisline so pri ravnanju z vrtljivimi kolonami QIAamp Mini potrebni naslednji previdnostni ukrepi za preprečevanje navzkrižnega onesnaženja med pripravami vzorcev:

- Vzorec ali raztopino previdno nanesite v vrtljivo kolono QIAamp Mini. Vzorec v vrtljivo kolono QIAamp Mini nanesite s pipeto in pri tem ne zmočite roba kolone.
- Pazite, da se s konico za pipete ne dotaknete membrane vrtljive kolone QIAamp Mini.
- Odpirajte samo po eno vrtljivo kolono QIAamp Mini hkrati in preprečite nastanek aerosolov.

Nastavitev vakuumskega sistema QIAvac 24 Plus

Prepričajte se, da ste pravilno nastavili vrtljivo kolono QIAamp Mini, podaljšek kolone VacConnector (VC) in ventil VacValve (glejte sliko 2).



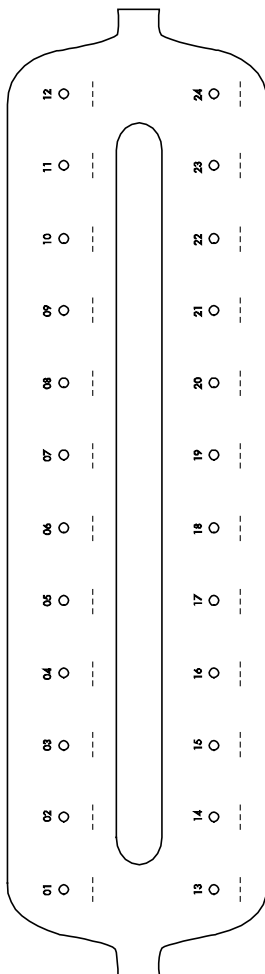
Slika 2. Sestavljanje komponent kompleta QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit za vakuumsko obdelavo vzorcev.
(1) VacValve, (2) VacConnector (VC) in vrtljiva kolona (3) QIAamp Mini.

Če uporabljate vakuumski postopek z vakuumskim sistemom QIAvac 24 Plus, priporočamo, da označite epruvete za lizo (LT), epruvete za elucijo (ET) in vrtljive kolone QIAamp Mini po shemi na sliki 3 (glejte naslednjo stran), da se izognete mešanju vzorcev. To sliko lahko fotokopirate in označite z imeni vzorcev. Priporočamo uporabo podobne sheme, če uporabljate druge vakuumske sisteme ali če uporabljate postopek centrifugiranja.

Datum: _____

Upravljavec: _____

ID št. poteka: _____



Slika 3. Shema označevanja epruvel za lizo (LT), epruvel za elucijo (ET) in vrtljivih kolon QIAamp Mini za uporabo na vakuumskem sistemu QIAvac 24 Plus.

Postopek

Protokol: Izolacija in prečiščevanje genomske DNK iz vzorcev krvi z uporabo mikrocentrifuge/samodejnega prečiščevanja na QIAcube Connect MDx

Za izolacijo in prečiščevanje genomske DNK iz 200 µl vzorcev polne krvi, obdelanih z EDTA ali citratom, z uporabo mikrocentrifuge ali avtomatizirano na QIAcube Connect MDx.

Pomembne točke pred začetkom

- Spodnji postopek vsebuje navodila za obdelavo enega vzorca krvi. Vendar pa je mogoče obdelati več vzorcev hkrati; število je odvisno od zmogljivosti uporabljene mikrocentrifuge.
- Na instrumentu QIAcube Connect MDx se lahko izvede avtomatizirana obdelava 2–10 ali 12 vzorcev.
- Pri avtomatizaciji upoštevajte navodila na uporabniškem vmesniku (QIAcube Connect MDx) in glejte uporabniški priročnik *QIAcube Connect MDx* (ki ga najdete na zavihku z viri na strani z izdelki na spletnem mestu www.qiagen.com).

Navodila pred začetkom

- Vzorce krvi izenačite s sobno temperaturo in zagotovite, da so dobro premešani.
- Poskrbite, da bodo vsi reagenti in vrtljive kolone QIAamp Mini (v zaprtih pretisnih oмотih) ogreti na sobno temperaturo.
- Nastavite grelni blok na 56 °C za uporabo v 4. koraku (zahtevano pri ročnem in avtomatiziranem postopku z zunanjo ročno lizo).
- Prepričajte se, da so bili pufer za spiranje 1 (AW1), pufer za spiranje 2 (AW2) in QIAGEN Protease (QP) pripravljeni v skladu z navodili v »Priprava reagentov in pufrov« na strani 22.

- Če se v pufru za lizo (AL) oblikuje oborina, se raztopi z inkubacijo pri 56 °C.
- Pri postopkih nadzora kakovosti družbe QIAGEN je uporabljen preskus funkcionalnosti kompletov pred dajanjem na trg, ki se opravi za vsako posamezno serijo kompletov. Zato ne mešajte reagentov iz različnih serij kompletov in ne kombinirajte posameznih reagentov iz različnih serij reagentov.

Postopek

- Za ročni postopek z mikrocentrifugo upoštevajte korake 1–15.
 - Ta postopek je mogoče avtomatizirati v 3 različnih različicah:
 - Volumen elucije: 100 µl, popolnoma avtomatizirano (avtomatizacija se začne od koraka 1 dalje).
 - Volumen elucije: 200 µl, popolnoma avtomatizirano (avtomatizacija se začne od koraka 1 dalje).
 - Ročna liza: delno avtomatizirano z zunanjo ročno lizo in volumni elucije 100–200 µl v korakih po 10 µl (avtomatizacija se začne po koraku 5).
1. S pipeto vnesite 20 µl proteaze QIAGEN Protease (QP) v epruveto za lizo (LT).
 - ⓘ Pred uporabo preverite rok uporabnosti rekonstituirane proteaze.
 2. V epruveto za lizo (LT) dodajte 200 µl vzorca krvi.
 3. V epruveto za lizo (LT) dodajte 200 µl pufru za lizo (AL), zaprite pokrov in mešajte s pulznim vrtinčenjem ≥ 15 sekund.
 - ⓘ Za zagotovitev učinkovitega liziranja je nujno, da se vzorec in pufer za lizo (AL) temeljito pomešata, da dobimo homogeno raztopino.
 - ⓘ Ker ima pufer za lizo (AL) visoko viskoznost, poskrbite, da boste s previdnim pipetiranjem in z uporabo ustrezne pipete dodali pravilno količino pufru za lizo (AL).
 - ⓘ Ne dodajajte proteaze QIAGEN Protease (QP) neposredno v pufer za lizo (AL).

4. Inkubirajte pri temperaturi 56 °C 10 minut.
5. Epruveto za lizo (LT) centrifugirajte ≥ 5 sekund s polno hitrostjo, da odstranite kapljice z notranje strani pokrova.
 - ❗ Če je bila ročna liza (koraki 1–5) izvedena izven plošče, je mogoče naslednje korake (6–15) avtomatizirati na QIAcube Connect MDx s pomočjo protokola za ročno lizo.
6. V epruveto za lizo (LT) dodajte 200 μ l etanola (96–100 %), zaprite pokrov in temeljito mešajte s pulznim vrtinčenjem ≥ 15 sekund.
7. Epruveto za lizo (LT) centrifugirajte ≥ 5 sekund s polno hitrostjo, da odstranite kapljice z notranje strani pokrova.
8. Previdno nanesite celoten lizat od koraka 7 v vrtljivo kolono QIAamp Mini, ne da bi zmočili rob. Pazite, da se s konico za pipete ne dotaknete membrane vrtljive kolone QIAamp Mini.
 - ❗ Če obdelujete več vzorcev, naenkrat odprite le eno epruveto za lizo (LT).
9. Zaprite pokrov vrtljive kolone QIAamp Mini in 1 minuto centrifugirajte pri približno 6000 x g. Vrtljivo kolono QIAamp Mini postavite v čisto epruveto za spiranje (WT) in zavržite epruveto, ki vsebuje filtrat.
 - ❗ Če lizat po centrifugiranju pri 6000 x g (8000 vrt/min) še ni povsem prešel skozi membrano, ga ponovno centrifugirajte 1 minuto pri polni hitrosti (do 20.800 x g).
 - ❗ Če lizat med centrifugiranjem še vedno ne preide skozi membrano, zavržite vzorec in ponovite izolacijo in prečiščevanje z novim vzorcem, pri čemer začnite s korakom 1 na strani 27.
10. Previdno odprite vrtljivo kolono QIAamp Mini in dodajte 500 μ l pufru za spiranje 1 (AW1), ne da bi zmočili rob. Pazite, da se s konico za pipete ne dotaknete membrane vrtljive kolone QIAamp Mini.
11. Zaprite pokrov vrtljive kolone QIAamp Mini in 1 minuto centrifugirajte pri približno 6000 x g. Vrtljivo kolono QIAamp Mini postavite v čisto epruveto za spiranje (WT) in zavržite epruveto, ki vsebuje filtrat.


12. Previdno odprite vrtljivo kolono QIAamp Mini in dodajte 500 µl pufru za spiranje 2 (AW2), ne da bi zmočili rob. Pazite, da se s konico za pipete ne dotaknete membrane vrtljive kolone QIAamp Mini.


13. Zaprite pokrov vrtljive kolone QIAamp Mini in 1 minuto centrifugirajte pri polni hitrosti (približno 20.000 x g, ali 14.000 vrt/min). Vrtljivo kolono QIAamp Mini postavite v čisto epruveto za spiranje (WT) in zavržite epruveto, ki vsebuje filtrat.

Približno 3 minute centrifugirajte pri polni hitrosti (približno 20.000 x g, ali 14.000 vrt/min), da povsem posušite membrano.


 Opustitev suhega centrifugiranja lahko privede do zaviranja zaključnega testa.


14. Vrtljivo kolono QIAamp Mini postavite v novo epruveto za elucijo (ET) in zavržite epruveto za spiranje (WT), ki vsebuje filtrat. Previdno odprite pokrov vrtljive kolone QIAamp Mini in nanesite od 50 do 200 µl pufru za elucijo (AE) na sredino membrane.

 Pomembno je, da uporabite novo epruveto za elucijo, da preprečite onesnaženje z ostanki pufru za spiranje, ki lahko povzroči zaviranje pri zaključnem testu.

 Še posebej pri manjših volumnih elucije je pomembno, da pufer za elucijo (AE) porazdelite na sredino membrane, da zagotovite optimalno pridobivanje nukleinskih kislin in pufru za elucijo (AE).

15. Zaprite pokrov in inkubirajte pri sobni temperaturi 1 minuto. Približno 1 minuto centrifugirajte pri 6000 x g (8000 vrt/min), da eluirate DNK.

 Pokrovčke epruвет za elucijo usmerite tako, da bodo obrnjeni v smer, nasprotno vrtenju rotorja (če se rotor, na primer, vrti v smeri urnega kazalca, usmerite pokrovčke v nasprotni smeri urnega kazalca).

 V primeru vseh avtomatiziranih postopkov eluate odstranite iz instrumenta takoj po končanem postopku in jih pravilno shranite.

Protokol: Izolacija in prečiščevanje genomske DNK iz vzorcev krvi z uporabo vakuumskega sistema

Za izolacijo in prečiščevanje genomske DNK iz 200 µl vzorcev polne krvi, obdelanih z EDTA ali citratom, z uporabo vakuumskega sistema, kot je vakuumski sistem QIAvac 24 Plus.

Pomembno pred začetkom

Spodnji postopek vsebuje navodila za obdelavo enega vzorca krvi. V vakuumskem sistemu QIAvac 24 Plus pa je mogoče hkrati obdelati do 24 vzorcev.

Navodila pred začetkom

- Vzorce krvi izenačite s sobno temperaturo in zagotovite, da so dobro premešani.
- Poskrbite, da bodo vsi reagenti in vrtljive kolone QIAamp Mini (v zaprtih pretisnih oмотih) ogreti na sobno temperaturo.
- Grelni blok nastavite na 56 °C za uporabo v koraku 4.
- Prepričajte se, da so bili pufer za spiranje 1 (AW1), pufer za spiranje 2 (AW2) in QIAGEN Protease (QP) pripravljeni v skladu z navodili v »Priprava reagentov in pufrov« na strani 22.
- Če se v pufru za lizo (AL) oblikuje oborina, se raztopi z inkubacijo pri 56 °C.
- Za zmanjšanje navzkrižnega onesnaženja, vstavite podaljšek kolone VacConnector (VC) v vsak adapter Luer vakuumskega sistema.
- Prepričajte se, da je steklenica za odpadke vakuumskega sistema prazna in da so vse spojke pravilno priključene.
- Za podrobnosti o delovanju vakuumskega sistema, zlasti o vzdrževanju, glejte priloženi priročnik.
- Pri postopkih nadzora kakovosti družbe QIAGEN je uporabljen preskus funkcionalnosti kompletov pred dajanjem na trg, ki se opravi za vsako posamezno serijo kompletov. Zato ne mešajte reagentov iz različnih serij kompletov in ne kombinirajte posameznih reagentov iz različnih serij reagentov.

Postopek

1. S pipeto vnesite 20 µl proteaze QIAGEN Protease (QP) v epruveto za lizo (LT).
 - ⓘ Pred uporabo preverite rok uporabnosti rekonstituirane proteaze.
2. V epruveto za lizo (LT) dodajte 200 µl vzorca krvi.
3. V epruveto za lizo (LT) dodajte 200 µl pufru za lizo (AL), zaprite pokrov in mešajte s pulznim vrtinčenjem ≥ 15 sekund.
 - ⓘ Za zagotovitev učinkovitega liziranja je nujno, da se vzorec in pufer za lizo (AL) temeljito pomešata, da dobimo homogeno raztopino.
 - ⓘ Ker ima pufer za lizo (AL) visoko viskoznost, poskrbite, da boste s previdnim pipetiranjem in z uporabo ustrezne pipete dodali pravilno količino pufru za lizo (AL).
 - ⓘ Ne dodajajte proteaze QIAGEN Protease (QP) neposredno v pufer za lizo (AL).
4. Inkubirajte pri temperaturi 56 °C 10 minut.
5. Epruveto za lizo (LT) centrifugirajte ≥ 5 sekund s polno hitrostjo, da odstranite kapljice z notranje strani pokrova.
6. V epruveto za lizo (LT) dodajte 200 µl etanola (96–100 %), zaprite pokrov in temeljito mešajte s pulznim vrtinčenjem ≥ 15 sekund.
7. Epruveto za lizo (LT) centrifugirajte ≥ 5 sekund s polno hitrostjo, da odstranite kapljice z notranje strani pokrova.
8. Vstavite vrtljivo kolono QIAamp Mini v podaljšek kolone VacConnector (VC) na vakuumskem sistemu. Prepričajte se, da sta glavni vakuumski ventil (med vakuumskim sistemom in vakuumskim sklopom) in ventil z navojnim pokrovčkom (na vakuumskem sklopu) zaprta. Vklopite vakuumsko črpalko.

Zavržite epruveto za spiranje (WT) (2 ml), v katero je v pretisnem omotu nameščena vrtljiva kolona QIAamp Mini.

Vakuum se uporabi samo za povezovalni sistem (če se uporablja) in ne za vakuumski sklop.

9. Previdno nanesite celoten lizat od koraka 7 v vrtljivo kolono QIAamp Mini, ne da bi zmočili rob. Pazite, da se s konico za pipete ne dotaknete membrane vrtljive kolone QIAamp Mini.



Če obdelujete več vzorcev, naenkrat odprite le eno epruveto za lizo (LT).

10. Odprite glavni vakuumski ventil. Ko se lizat povleče skozi vrtljivo kolono QIAamp Mini, zaprite glavni vakuumski ventil in odprite ventil z navojnim pokrovčkom na vakuumskem sklopu, da odzračite sklop. Po sprostitvi vakuuma iz sklopa zaprite ventil z navojnim pokrovčkom.

Po zaprtju glavnega vakuumskega ventila se vakuum uporabi samo za povezovalni sistem (če se uporablja) in ne za vakuumski sklop.



Za hiter izpust vakuuma uporabite ventil z navojnim pokrovčkom vakuumskega sklopa.



Če hkrati obdelujete več vrtljivih kolon QIAamp Mini, priporočamo, da zaprete VacValve vsake kolone po prehodu lizata, da skrajšate trajanje tega vakuumskega koraka.



Če lizat po 10 minutah še ni povsem prešel skozi membrano, postavite vrtljivo kolono QIAamp Mini v čisto epruveto za spiranje (WT), zaprite pokrov in 3 minute centrifugirajte pri 6000 x g (8000 vrt/min) ali dokler lizat ne preide v celoti skozi membrano. Vrtljivo kolono QIAamp Mini postavite v drugo čisto epruveto za spiranje (WT) in nadaljujte s korakom 10 protokola na strani 32.



Če lizat med centrifugiranjem še vedno ne preide skozi membrano, zavrzite vzorec in ponovite izolacijo in prečiščevanje z novim vzorcem, pri čemer začnite s korakom 1 na strani 31.

11. V vrtljivo kolono QIAamp Mini nanesite 750 µl pufru za spiranje 1 (AW1), ne da bi zmočili rob. Pazite, da se s konico za pipete ne dotaknete membrane vrtljive kolone QIAamp Mini. Pustite pokrov kolone odprt in odprite glavni vakuumski ventil. Ko se pufer za spiranje 1 (AW1) povleče skozi vrtljivo kolono QIAamp Mini, zaprite glavni vakuumski ventil in odprite ventil z navojnim pokrovčkom, da odzračite sklop. Po sprostitvi vakuuma iz sklopa zaprite ventil z navojnim pokrovčkom.

12. V vrtljivo kolono QIAamp Mini nanesite 750 µl pufru za spiranje 2 (AW2), ne da bi zmočili rob. Pazite, da se s konico za pipete ne dotaknete membrane vrtljive kolone QIAamp Mini. Pustite pokrov kolone odprt in odprite glavni vakuumski ventil. Ko se pufer za spiranje 2 (AW2) povleče skozi vrtljivo kolono QIAamp Mini, zaprite glavni vakuumski ventil in odprite ventil z navojnim pokrovčkom, da odzračite sklop. Po sprostitvi vakuuma iz sklopa zaprite ventil z navojnim pokrovčkom.
13. Zaprite pokrov vrtljive kolone QIAamp Mini, odstranite jo iz vakuumskega sistema in zavržite podaljšek kolone VacConnector (VC). Vrtljivo kolono QIAamp Mini postavite v čisto epruveto za spiranje (WT) in 3 minute centrifugirajte pri polni hitrosti (približno 20.000 x g ali 14.000 vrt./min.), da se membrana povsem posuši.
- ❗ Oпустitev suhega centrifugiranja lahko privede do zaviranja zaključnega testa.
14. Vrtljivo kolono QIAamp Mini postavite v novo epruveto za elucijo (ET) in zavržite epruveto za spiranje (WT), ki vsebuje filtrat. Previdno odprite pokrov vrtljive kolone QIAamp Mini in nanesite od 50 do 200 µl pufru za elucijo (AE) na sredino membrane.
- ❗ Pomembno je, da uporabite novo epruveto za elucijo (ET), da preprečite onesnaženje z ostanki pufru za spiranje, ki lahko povzroči zaviranje pri zaključnem testu.
 - ❗ Še posebej pri manjših volumnih elucije je pomembno, da pufer za elucijo (AE) porazdelite na sredino membrane, da zagotovite optimalno pridobivanje nukleinskih kislin in pufru za elucijo (AE).
15. Zaprite pokrov in inkubirajte pri sobni temperaturi 1 minuto. 1 minuto centrifugirajte pri 6000 x g (8000 vrt/min), da eluirate DNK.
- ❗ Pokrovčke epruвет za elucijo (ET) usmerite tako, da bodo obrnjeni v smer, nasprotno vrtenju rotorja (če se rotor, na primer, vrti v smeri urnega kazalca, usmerite pokrovčke v nasprotni smeri urnega kazalca).
 - ❗ Po izvedbi tega protokola sledite postopku vzdrževanja vakuumskega sistema (za več podrobnosti glejte priložnik, priložen vakuumskemu sistemu).

Nadzor kakovosti

V skladu s sistemom vodenja kakovosti družbe QIAGEN, certificiranim po standardu ISO, se vsaka serija kompleta QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit preskusi v skladu z vnaprej določenimi specifikacijami, s čimer se zagotovi stalna kakovost izdelka.

Omejitve

Učinkovitost sistema je bila ugotovljena z uporabo polne krvi za izolacijo genske DNK.

Informacije o uporabi kompleta QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit so v razdelku »Opis in načelo delovanja«. Avtomatizirani postopek je podrobno opisan v razdelku »Protokol: Izolacija in prečiščevanje genske DNK iz vzorcev krvi z uporabo mikrocentrifuge/samodejnega prečiščevanja na QIAcube Connect MDx«.

Uporabnik je sam odgovoren za potrjevanje učinkovitosti sistema za kakršne koli postopke, izvedene v laboratoriju, ki jih študije učinkovitosti QIAGEN ne zajemajo.

Pri zaključnih postopkih je treba uporabiti zadostne kontrole in tako zmanjšati tveganje za negativen vpliv na diagnostične rezultate. Za nadaljnjo validacijo priporočamo smernice Mednarodne konference o usklajevanju tehničnih zahtev (ICH) iz publikacije ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology (Validacija analitičnih postopkov: besedilo in metodologija).

Vsi generirani diagnostični rezultati morajo biti interpretirani v povezavi z drugimi kliničnimi ali laboratorijskimi ugotovitvami.

Značilnosti delovanja

Veljavne značilnosti delovanja najdete na zavihku na strani z izdelki na spletnem mestu www.qiagen.com.

Navodila za odpravljanje težav

Ta navodila za odpravljanje težav vam lahko pomagajo pri odpravljanju morebitnih težav. Za več informacij glejte tudi stran s pogostimi vprašanji v našem Centru za tehnično pomoč: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Znanstveniki v Tehnični službi QIAGEN bodo vedno z veseljem odgovorili na vsa vprašanja, ki jih morda imate glede informacij in/ali protokolov v tem priročniku ali o tehnologijah vzorčenja in analiziranja (za kontaktne informacije obiščite naše spletno mesto www.qiagen.com).

Priporombe in predlogi

Splošno ravnanje

- a) Mašenje konic pipet med prenosom vzorcev
- Pred prenosom vzorcev temeljito zmešajte vzorce krvi (npr. tako, da epruvete večkrat obrnete). Zamrznjene vzorce je treba hitro odtaliti v vodni kopeli s temperaturo 37 °C in pri tem rahlo mešati, da bo mešanje temeljito, nato pa pred začetkom postopka izenačiti temperaturo s sobno (15–25 °C).
- Poskusite preprečiti krvne strdke v vzorcih in prenašajte vzorec brez strdkov. Krioprecipitati, ki nastanejo med odmrzovanjem zamrznjenih vzorcev, bodo zamašili membrano vrtljive kolone QIAamp Mini ali pa povzročili težave med avtomatiziranim postopkom.
- b) Zamašena vrtljiva kolona QIAamp Mini
- Potek dela pri vrtenju:**
- Če lizat po centrifugiranju pri 6000 x g (8000 vrt/min) še ni povsem prešel skozi membrano, ga ponovno centrifugirajte 1 minuto pri polni hitrosti (do 20.800 x g).
- Če lizat med centrifugiranjem še vedno ne preide skozi membrano, zavrzite vzorec in ponovite izolacijo in prečiščevanje z novim vzorcem, pri čemer začnite s korakom 1.
- Potek dela pri vakuumu:**
- Če se pretok zmanjša, se lahko podaljša čas vakumiranja.
- Podredno, če je bil uporabljen, zaprite VacValve in previdno odstranite sklop VacConnector – VacValve iz vrtljive kolone QIAamp Mini, ne da bi pri tem izgubili kakšen lizat.
- Odstranite vrtljivo kolono QIAamp Mini iz vakuumskega sklopa, položite jo v 2-mililitrsko epruveto za spiranje in jo centrifugirajte pri polni hitrosti, dokler vzorec popolnoma ne preide skozi membrano. Zamenjajte sklop VacConnector – VacValve, ki vsebuje preostali lizat. Vključite vakuumsko črpalko, odprite VacValve in nadaljujte z nalaganjem preostalega lizata.
- Če se vrtljiva kolona QIAamp Mini ponovno zamaši, ponovite zgornji postopek.
- Če lizat med centrifugiranjem še vedno ne preide skozi membrano, zavrzite vzorec in ponovite izolacijo in prečiščevanje z novim vzorcem, pri čemer začnite s korakom 1.
- Splošne informacije**
- Zaradi večkratnega zamrzovanja in odmrzovanja se lahko pojavijo krioprecipitati. Ti lahko blokirajo vrtljivo kolono QIAamp Mini. Ne uporabljajte vzorcev krvi, ki so bili zamrznjeni in odmrznjeni več kot trikrat. Zamrznjene vzorce je treba hitro odtaliti v vodni kopeli s temperaturo 37 °C in pri tem rahlo mešati, da bo mešanje temeljito, nato pa pred začetkom postopka izenačiti temperaturo s sobno (15–25 °C).

Pripombe in predlogi

- | | | |
|----|--|---|
| c) | V pufru za lizo (AL) je nastal precipitat. | Raztopite z inkubacijo pufra za lizo (AL) pri temperaturi 56 °C. |
| d) | Spremenljivi elucijski volumni | <p>Volumen zbranega eluata je odvisen od lastnosti vzorca.</p> <p>Zaradi preostalega pufra za elucijo (AE), ki ga je po centrifugiranju zadržala membrana vrtljive kolone, je lahko dobljeni volumen eluata manjši od volumna pufra za elucijo, ki je nanesen na kolono.</p> <p>Nanesite pufer za elucijo (AE) na središče membrane. Še posebej pri manjših volumnih elucije je pomembno, da pufer za elucijo (AE) porazdelite na sredino membrane, da zagotovite optimalno pridobivanje nukleinskih kislin in pufra za elucijo (AE).</p> |
| e) | Vakuumski tlak v višini približno 800–900 mbar ni dosežen. | <p>Vakuumski sklop ni tesno zaprt. Ko je vakuum vklopljen, pritisnite pokrov vakuumskega sklopa. Preverite, ali je dosežen vakuumski tlak. Tesnilo pokrova QIAvac se je izrabilo. Vizualno preverite tesnilo sklopa in ga po potrebi zamenjajte.</p> <p>VacValves so se obrabile. Odstranite vse VacValves in vstavite VacConnectors (VC) neposredno v podaljške luerja. Vstavite vrtljive kolone QIAamp Mini v VacConnectors (VC), zaprite pokrov kolon in vklopite vakuum. Preverite, ali je dosežen vakuumski tlak. Po potrebi zamenjajte VacValves.</p> <p>Povezava z vakuumsko črpalko ne tesni. Zaprite vse podaljške luerja s čepki luerja in vklopite vakuumsko črpalko. Po vklopu črpalke preverite, ali je vakuumski tlak stabilen (in ventil Vacuum Regulator zaprt). Po potrebi zamenjajte povezave med črpalko in vakuumskim sklopom.</p> <p>Če vakuumski tlak še vedno ni dosežen, zamenjajte vakuumsko črpalko z močnejšo.</p> |
| f) | Pri težavah pri avtomatiziranem poteku dela | Oglejte si uporabniški priročnik <i>QIAcube Connect MDx</i> (ki ga najdete na zavihku z viri na strani z izdelki na spletnem mestu www.qiagen.com). |

Majhen izkoristek DNK

- | | | |
|----|--|---|
| a) | Nepopolna liza vzorca | <p>Če je bila proteaza QIAGEN Protease (QP) dalj časa izpostavljena povišani temperaturi, lahko izgubi aktivnost. Postopek ponovite z uporabo novih vzorcev in sveže proteaze QIAGEN Protease (QP).</p> <p>Poskrbite, da boste proteazo QIAGEN Protease (QP) raztopili z topilom proteaze (PS) v skladu z zgornjimi navodili. Da se izognete penjenju, zmešajte tako, da vialo večkrat obrnete. Prepričajte se, da je proteaza QIAGEN Protease (QP) popolnoma raztopljena. Ne dodajajte proteaze QIAGEN Protease (QP) neposredno v pufer za lizo (AL).</p> <p>Za zagotovitev učinkovitega liziranja je nujno, da se vzorec in pufer za lizo (AL) temeljito pomešata, da dobimo homogeno raztopino. Ker ima pufer za lizo (AL) visoko viskoznost, poskrbite, da boste s previdnim pipetiranjem in z uporabo ustrezne pipete dodali pravilno količino pufra za lizo (AL).</p> |
| b) | Uporabljen etanol z nižjim odstotkom od 96–100 % | Postopek čiščenja ponovite z novimi vzorci in 96–100-odstotnim etanolom. Ne uporabljajte denaturiranega alkohola, ki vsebuje druge snovi, kot je metanol ali metiletilketon. |
| c) | Napačno pripravljen Buffer AW1 ali Buffer AW2 | Prepričajte se, da sta bila koncentrata pufra Buffer AW1 in Buffer AW2 razredčena s pravilnim volumnom 96–100-odstotnega etanola, in jih zmešajte tako, da pred začetkom postopka steklenico večkrat obrnete. |

Priporobe in predlogi












- | | | |
|----|---|--|
| d) | Vzorci krvi niso bili pravilno shranjeni. | Izkoristek in kakovost očiščene DNK sta odvisna od pogojev shranjevanja krvi. Pri bolj svežih vzorcih so rezultati lahko boljši. Pri kratkoročnem shranjevanju do 10 dni priporočamo shranjevanje pri temperaturi 2–8 °C. Vendar pri načinih uporabe, pri katerih je zahtevana največja velikost fragmentov, kot je Southernov prenos, priporočamo shranjevanje pri temperaturi 2–8 °C samo do 3 dni, saj po tem času pride do nizkih ravni razgradnje DNK. Pri dolgoročnem shranjevanju (daljšem od 10 dni) odzemi kri v epruvete, ki vsebujejo antikoagulant (če je zahtevana DNK z visoko molekularno maso, po možnosti EDTA), in jo shranite pri temperaturi –20 ali –80 °C. |
| e) | Zamrznjeni vzorci krvi po odtajanju niso bili pravilno zmešani. | Zamrznjene vzorce je treba hitro odtaliti v vodni kopeli s temperaturo 37 °C in pri tem rahlo mešati, da bo mešanje temeljito, nato pa pred začetkom postopka izenačiti temperaturo s sobno (15–25 °C). |












DNK pri zaključnih reakcijah ne delujeta dobro.

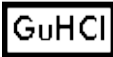





- | | | |
|----|---|---|
| a) | V eluatu je malo ali nič DNK. | Za možne vzroke glejte »Majhen izkoristek DNK« zgoraj. Če je možno, povečajte količino eluata, dodanega v reakcijo. |
| b) | Uporabljen neprimeren elucijski volumen | Določite največji volumen eluata, ki je primeren za vaše zaključne postopke. Ustrezno zmanjšajte ali povečajte količino eluata, dodanega v zaključne postopke. Volumen elucije se lahko sorazmerno prilagodi. Elucija z manjšimi količinami Buffer AE vodi do višjih koncentracij nukleinske kisline, vendar lahko povzroči manjši skupni izkoristek. |
| c) | Uporabljene ni dovolj DNK. | Kvantificirajte očiščeno DNK s spektrofotometrično meritvijo absorbanca pri 260 nm. |
| d) | Uporabljene je preveč DNK. | Preveč DNK lahko zavre nekatere encimske reakcije. Kvantificirajte očiščeno DNK s spektrofotometrično meritvijo absorbanca pri 260 nm. |
| e) | Potencialni prenos zaviralca. | Poskrbite, da boste pred elucijo izvedli korak suhega centrifugiranja, da preprečite potencialno zaviranje zaključnega testa. Pomembno je, da uporabite novo epruveto za elucijo (ET), da preprečite onesnaženje z ostanki pufra za spiranje, ki lahko povzroči zaviranje pri zaključnem testu. |

Simboli

V navodilih za uporabo ali na embalaži in oznaki se pojavijo naslednji simboli:

Simbol	Opredelevanje simbola
	Vsebuje dovolj reagentov za <N> reakcij
	Uporabno do
	Ta izdelek izpolnjuje zahteve evropske direktive 2017/746 za diagnostične medicinske pripomočke in vitro.
	Diagnostični medicinski pripomoček in vitro
	Ob dobavi
	Odprite ob dostavi; vrtljive kolone QIAamp Mini hranite pri temperaturi 2–8 °C.
	Kataloška številka
	Serijska številka
	Številka materiala (npr., označevanje komponent)
	Komponente
	Vsebuje

Simbol	Opredelitev simbola
	Številka
	Globalna trgovinska identifikacijska številka
Rn	R pomeni revizijo navodil za uporabo, n pa številko revizije
	Omejitev temperature
	Proizvajalec
	Glejte navodila za uporabo
	Volumen
	Zapišite tekoči datum, ko v stekleničko dodate etanol
	Dodajanje
	Liofilizirano
	Rekonstituirano v
	Etanol

Simbol	Opredelitev simbola
	Gvanidinijev klorid
	Subtilisin
	Vodi do
	Glejte navodila za uporabo
	Pomembna opomba
	Enolični identifikator pripomočka

Informacije za naročanje

Izdelek	Vsebina	Kat. št.
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (50)	Za 50 pripravkov: vrtljive kolone QIAamp Mini Spin, pufri, reagenti, epruvete, VacConnectors	61104
Sorodni izdelki		
QIAcube Connect MDx*	Instrument in enoletna garancija na dele in delo	9003070
Pribor		
QIAvac 24 Plus†	Vakuumski sklop za obdelavo 1–24 vrtljivih kolon: vključuje vakuumski sklop QIAvac 24 Plus Vacuum manifold, priključke luer, hitre spojke	19413
Vacuum Pump (230 V, 50 Hz)†	Univerzalna vakuumška črpalka (zmogljivost 34 litrov/minuto, vakuum 8 mbar abs.)	84020
VacConnectors (500)†	500 priključkov za enkratno uporabo za uporabo z vrtljivimi kolonami QIAamp na priključkih Luer	19407
VacValves (24)	24 ventilov za uporabo s QIAvac 24 in QIAvac 24 Plus	19408
Vacuum Regulator	Za uporabo s sklopi QIAvac.	19530
QIAvac Connecting System	Sistem za povezavo vakuumskega sklopa z vakuumsko črpalko: vključuje pladenj, odpadne stekleničke, epruvete, spojke, ventil, merilnik, 24 VacValves.	19419

Izdelek	Vsebina	Kat. št.
Rotor Adapters (10 x 24)	Za 240 pripravkov: 240 vrtljivih adapterjev za enkratno uporabo in 240 epruvel za elucijo (1,5 ml); za uporabo s QIAcube Connect MDx	990394
Rotor Adapter Holder	Držalo za 12 vrtljivih adapterjev za enkratno uporabo; za uporabo s QIAcube Connect MDx	990392
Sample Tubes CB (2 ml)	1000 stožčastih epruvel z navojnim pokrovčkom brez podstavka (2 ml) za uporabo s QIAcube Connect MDx	990382
Shaker Rack Plugs	Čepi za stojalo za stresanje (12)	9017854
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Steklenice z reagentom (30 ml) s pokrovi, 6 v paketu; za uporabo s QIAcube Connect MDx	990393
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Konice za filtre za enkratno uporabo, na stojalu; (8 x 128). Za uporabo s QIAcube Connect MDx.	990352
Filter-Tips, 1000 µl, wide-bore (1024)	Konice za filtre za enkratno uporabo, na stojalu; (8 x 128); niso potrebne za vse protokole. Za uporabo s QIAcube Connect MDx.	990452
Filter-Tips, 200 µl (1024)	Konice za filtre za enkratno uporabo, na stojalu; (8 x 128). Za uporabo s QIAcube Connect MDx in instrumenti QIASymphony SP/AS.	990332

* QIAcube Connect MDx ni na voljo v vseh državah. Za dodatne podrobnosti se obrnite na tehnično službo družbe QIAGEN.

† Za uporabo z vakuumskimi protokoli.

Posodobljene informacije o licenciranju in zavrnitve odgovornosti za izdelek so na voljo v navodilih za uporabo zadevnega kompleta znamke QIAGEN. Navodila za uporabo kompletov znamke QIAGEN so na voljo na spletni strani www.qiagen.com, lahko pa jih tudi naročite pri tehnični službi družbe QIAGEN ali lokalnem distributerju.

Zgodovina revizije dokumenta

Revizija

Opis

R1, junij 2022

Različica 3, revizija 1

- Posodobitev na različico kompleta 3 za skladnost z IVDR
- Posodobitev poglavja Opis in načelo delovanja
- Posodobitev poglavij Potrebna oprema, ki je vključena v dobavo (dodatek aktivnih sestavin) in Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo
- Posodobitev poglavja Opozorila in previdnostni ukrepi (dodatek razdelkov Informacije za nujne primere in Odstranjevanje)
- Posodobitev poglavja Shranjevanje in ravnanje z reagenti
- Posodobitev poglavja Zbiranje in shranjevanje vzorcev ter ravnanje z njimi
- Posodobitev poglavja Pomembne opombe in postopki
- Posodobitev poglavja Omejitve
- Posodobitev poglavja Značilnosti delovanja
- Posodobitev razdelka Simboli
- Posodobitev poglavja Informacije za naročanje

Ta stran je namenoma prazna.

Sporazum o licenčnih omejitvah za komplet QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

Kupec ali uporabnik izdelka z njegovo uporabo soglašaja z naslednjimi pogoji:

1. Izdelek se lahko uporablja zgolj v skladu s protokoli, ki so priloženi izdelku, in s to knjižico ter skupaj s sestavnimi deli iz panela. QIAGEN v okviru svoje intelektualne lastnine ne ponuja licenc za uporabo ali kombiniranje priloženih sestavnih delov tega panela s sestavnimi deli, ki niso priloženi temu panelu, razen kot je opisano v protokolih, ki so priloženi izdelku, tem priročniku in dodatnih protokolih, ki so na voljo na www.qiagen.com. Nekatere od teh dodatnih protokolov so ustvarili uporabniki QIAGEN za uporabnike QIAGEN. Družba QIAGEN teh protokolov ni temeljito testirala ali optimizirala. Družba QIAGEN ne ponuja garancije ali jamstva, da ti ne kršijo pravic drugih strank.
2. Razen izrecno navedenih licenc družba QIAGEN ne daje drugih jamstev, da ta panel in/ali njegova uporaba ne krši pravic tretjih strank.
3. Ta panel in njegovi sestavni deli so licencirani za enkratno uporabo in jih ni dovoljeno ponovno uporabiti, obnoviti ali prodajati naprej.
4. QIAGEN zlasti zavrača kakršne koli druge licence, izrecne ali nakazane, razen tistih, ki so izrecno navedene.
5. Kupec in uporabnik tega panela se strinjata, da ne bosta ukrepala ali dovolila drugim, da ukrepajo v smeri, ki bi vodila v ali omogočala katerega od zgoraj prepovedanih dejanj. QIAGEN lahko prepovedi iz tega Sporazuma o licenčnih omejitvah uveljavlja na katerem koli sodišču ter dobi povrnjene vse svoje stroške za preiskavo in sodišče, vključno s stroški za odvetnika, pri katerem koli dejanju za uveljavitev tega Sporazuma o licenčnih omejitvah ali pravice intelektualne lastnine v povezavi s tem panelom in/ali njegovimi sestavnimi deli.

Za posodobljene licenčne pogoje glejte www.qiagen.com.

Blagovne znamke: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAcube® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co. KG).

Jun-2022 HB-3030-001 1127543SL © 2022 QIAGEN, vse pravice pridržane.

Naročila www.qiagen.com/shop | Tehnična podpora support.qiagen.com |
Spletno mesto www.qiagen.com